

Определение РНК-связывающих доменов субъединицы PCID2 комплекса TREX-2 *Drosophila melanogaster***Научный руководитель – Копытова Дарья Владимировна****Вдовина Юлия Андреевна**

Аспирант

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия

E-mail: strasbourg77@gmail.com

Белок PCID2 входит в состав эволюционно консервативного комплекса TREX-2, участвующего в ядерном экспорте мРНК у эукариот. PCID2 является одной из основных субъединиц комплекса и его нокадаун приводит к нарушению распределения мРНК между ядром и цитоплазмой клетки. PCID2 также участвует в процессе транспорта локализуемой мРНК в цитоплазме вне комплекса TREX-2. До настоящего времени функции белка PCID2 *D. melanogaster* остаются малоизученными.

При кристаллизации части комплекса TREX-2 дрожжей, гомологи субъединиц PCID2 и Xmas-2 образовывали общую поверхность, необходимую для взаимодействия с РНК [1]. По другим данным, PCID2 дрожжей может связывать РНК *in vitro* независимо от других субъединиц комплекса [2]. В нашей работе было исследовано взаимодействие PCID2 *D. melanogaster* с фрагментами мРНК гена *ras64B* методом EMSA. мРНК гена *ras64B* была выбрана, поскольку PCID2 взаимодействует с ней в реакциях RIP. Было показано, что PCID2 эффективно и специфично связывает фрагмент из 3'-нетранслируемой области мРНК без участия Xmas-2.

На С-конце гомолога PCID2 дрожжей были определены сайты взаимодействия с мРНК [2]. Нами было показано, что удаление 35 С-концевых аминокислот у PCID2 *D. melanogaster* (PCID2¹⁻³⁶⁰) приводит к значительному снижению эффективности связывания РНК. Одновременно результат исследования указывал на существование дополнительного участка связывания с РНК. Кроме того, в эксперименте по ко-иммунопреципитации PCID2¹⁻³⁶⁰ и Xmas-2 из лизата S2 клеток *D. melanogaster* было показано, что С-концевой домен PCID2 также участвует во взаимодействии с Xmas-2.

С целью обнаружения всех доменов взаимодействия с РНК были получены белки, соответствующие N, M и C фрагментам белка PCID2. Методом EMSA было установлено, что во взаимодействие с мРНК *ras64B* вовлечены два домена белка - M и C. При этом С-домен показывал специфичное взаимодействие, тогда как M-домен - неспецифичное.

Анализ последовательности M-домена PCID2 позволил определить вероятные сайты взаимодействия с РНК. Внесение точечных мутаций по этим сайтам привело к исчезновению связывания РНК белком PCID2. Также методом FISH с меченым oligo-dT праймером было исследовано влияние мутаций в M-домене на восстановление экспорта мРНК при нокадауне PCID2 и последующей трансфекции PCID2-мутантами. Было показано, что PCID2 с мутациями в M-домене не способен восстановить нормальный фенотип S2 клеток.

Таким образом, было показано, что белок PCID2 *D. melanogaster* специфично взаимодействует с мРНК; взаимодействие локализуется в серединной и С-концевой областях; взаимодействие в M-домене необходимо для взаимодействия С-концевого домена PCID2 с мРНК.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ, № 22-14-00270.

Источники и литература

- 1) Ellisdon A. M. et al. Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex // Nat Struct Mol Biol. 2012. V. 19. No 3. P. 328-36.
- 2) Gallardo M. et al. Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism // J Biol Chem. 2003. V. 278. No 26. P. 24225-32.